



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08062219 A**(43) Date of publication of application: **08.03.96**

(51) Int. Cl

**G01N 33/576**(21) Application number: **06216781**(22) Date of filing: **19.08.94**(71) Applicant: **DAINABOTSUTO KK**(72) Inventor: **INOUE YUZO  
TAKEI TOSHINORI  
TOKITA SUSUMU****(54) ANTIBODY ASSAY REAGENT FOR REDUCTION  
TYPE ANTIGEN, AND MEASURING METHOD  
USING THE REAGENT**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To measure an antibody for a anti-reduction type HCV antibody, especially for a 33C antigen accurately at a high sensitivity in an assay method for identification of the existence of an antibody immunologically reactive with hepatitis C virus (HCV) antigen in a sample.

**CONSTITUTION:** An antigen employs at least a protein antigen coded to an NS3 area on an HCV genome or peptide having an action equivalent thereto and is

converted or held so that the antigen keeps the form of a reduction type NS3-related antigen, which makes measurement of a anti-reduction type HCV antibody with a high sensitivity possible. In the treatment for converting or holding the antigen, the reduction type NS3-related antigen is held in a dry condition, in an inert gas or with the presence of a deoxidation agent or a thiol group is protected or modified by a modification reagent or a residual cysteine group is modified by a gene recombination technique, for example, a mutagenesis method for a specified part. Thus, the reduction type NS3-related antigen is produced as mutant recombinant NS3-related antigen.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-62219

(43) 公開日 平成8年(1996)3月8日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/576

識別記号

Z

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平6-216781

(22) 出願日 平成6年(1994)8月19日

(71) 出願人 000109015

ダイナボット株式会社

東京都港区六本木1-9-9 六本木ファーストビル

(72) 発明者 井上 裕三

千葉県松戸市稔台344番地 ダイナボット株式会社総合研究所内

(72) 発明者 武井 俊憲

千葉県松戸市稔台344番地 ダイナボット株式会社総合研究所内

(72) 発明者 時田 進

千葉県松戸市稔台344番地 ダイナボット株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 水野 昭宣

(54) 【発明の名称】 還元型抗原に対する抗体アッセイ試薬及びそれを使用した測定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 試料中のC型肝炎ウイルス(HCV)抗原と免疫学的に反応性の抗体の存在を同定するためのアッセイ方法において、抗還元型HCV抗体特に、33C抗原に対する抗体を高い感度で正確に測定する。

【構成】 抗原としてHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを少なくとも用い、該抗原が還元型NS3関連抗原の形態を実質上保有するように変換または保持されていることにより、抗還元型HCV抗体を高い感度で測定できる。その変換保存処理は、還元型NS3関連抗原を乾燥状態、不活性ガス中あるいは脱酸素剤存在下で保持するとか、チオール基を、チオール基保護または修飾試薬で修飾するとか、システイン残基を、遺伝子組換え技術、例えば特定部位変異誘発法などにより修飾し、変異体リコンビナントNS3関連抗原として製造するとか、などである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体中のHCV抗体を免疫学的方法により測定するための抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、抗原としてHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを少なくとも用い、該抗原が還元型NS3関連抗原の形態を実質上保有するように変換または保持されていることを特徴とする試薬。

【請求項2】 該抗原中にはシステイン残基が存在し、該システイン残基は、以下（1）還元型NS3関連抗原を乾燥状態、不活性ガス中あるいは脱酸素剤存在下で保持する、（2）還元型NS3関連抗原中に存在するシステイン残基のチオール基を、チオール基保護または修飾試薬、例えばヨードアセトアミド、ヨード酢酸、p-クロロマーキュリ安息香酸、ヨウ化メチル、あるいは水銀、鉄、鉛などの金属などで修飾する、（3）還元型NS3関連抗原中に存在するシステイン残基を、遺伝子組換え技術、例えば特定部位変異誘発法などにより修飾し、変異体リコンビナントNS3関連抗原として製造する、（4）還元型NS3関連抗原を酸化防止剤の存在下使用直前まで保持する、（5）ジスルフィド結合（-S-S-）を開裂させて、チオール基を形成できる酵素、例えばジスルフィド・レダクターゼなどでNS3関連抗原を処理する、または（6）NS3関連抗原を存在するシステイン残基に基質親和性をもつもので処理するのいずれかの処理をなすことにより、該抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的に反応性の残基に変換するかまたはそのような残基を保持しているようにされることを特徴とする請求項1記載の試薬。

【請求項3】 抗原はその製造、分離及び／又は精製処理において実質的に還元状態あるいは酸素非存在下にそれらの処理がなされたものである請求項1又は2記載の試薬。

【請求項4】 NS3領域にコードされているタンパク質抗原が33Cである請求項1～3のいずれか一記載の試薬。

【請求項5】 抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを用いた検体中のHCV抗体の免疫学的測定方法において、抗原としてHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを少なくとも使用し、該抗原中に存在するシステイン残基を、抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的に反応性である残基に変換または保持しておくことを特徴とする検体中のHCV抗体の測定方法。

【請求項6】 該抗原中に存在するシステイン残基を、以下（1）還元型NS3関連抗原を乾燥状態、不活性ガス中あるいは脱酸素剤存在下で保持する、（2）還元型NS3関連抗原中に存在するシステイン残基のチオール

基を、チオール基保護または修飾試薬、例えばヨードアセトアミド、ヨード酢酸、p-クロロマーキュリ安息香酸、ヨウ化メチル、あるいは水銀、鉄、鉛などの金属などで修飾する、（3）還元型NS3関連抗原中に存在するシステイン残基を、遺伝子組換え技術、例えば特定部位変異誘発法などにより修飾し、変異体リコンビナントNS3関連抗原として製造する、（4）還元型NS3関連抗原を酸化防止剤の存在下使用直前まで保持する、

（5）ジスルフィド結合（-S-S-）を開裂させて、チオール基を形成できる酵素、例えばジスルフィド・レダクターゼなどでNS3関連抗原を処理する、または

（6）NS3関連抗原を存在するシステイン残基に基質親和性をもつもので処理するのいずれかをなすことにより、該抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的に反応性の残基に変換するかまたはそのような残基を保持しているようにすることを特徴とする請求項5記載の検体中のHCV抗体の測定方法。

【請求項7】 抗原はその製造、分離及び／又は精製処理において実質的に還元状態あるいは酸素非存在下にそれらの処理がなされたものである請求項5又は6記載の検体中のHCV抗体の測定方法。

【請求項8】 NS3領域にコードされているタンパク質抗原が33Cである請求項5～7のいずれか一記載の検体中のHCV抗体の測定方法。

【請求項9】 該抗原試薬を乾燥状態、脱酸素剤又は不活性ガス中で保存、又は測定のため使用するものである請求項5記載の検体中のHCV抗体の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、試料中のC型肝炎ウイルス（HCV）抗原と免疫学的に反応性の抗体の存在を同定するためのアッセイ、特に該抗原中に存在するシステイン残基を還元型あるいは還元型誘導体に変換あるいは保持し、特異的に該還元型抗原またはその還元型抗原誘導体と特異的に反応性の抗体を検出することに関する。HCVゲノムのNS3領域、特に33C抗原のシステイン残基が還元型あるいは還元型誘導体に変換されているかあるいはその還元型に保持されているものは、C型肝炎ウイルス（HCV）に曝された個体の体液中の抗体検出試薬として有用である。特に、本発明はC型肝炎ウイルス（HCV）に対する抗体を高い感度で測定すると共により正確に測定するための測定用試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 急性ウイルス肝炎は、これまでA型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）などのウイルスにより引き起こされていることが見出されてきているが、これらHAVやHBV、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バールウイルスに対する抗体が検出されない急性肝炎が臨床的に見出され、これを非A非B型肝炎（NANBH）と呼ぶことが提案された。HB

Vに対しては優れた試験法の開発が成功していることから、現在では輸血後肝炎の大部分が非A非B型肝炎であるという状況になっており、この意味でも非A非B型肝炎の有効な試験法の開発が求められた。

【0003】このような中であって、慢性非A非B型肝炎感染チンパンジーの血液から遺伝子組換え法によりクローニングされた非A非B型肝炎の因子はC型肝炎ウイルス（HCV）と名付けられた（欧州特許公開第318216号【EP-A-0318216】、同第388232号【EP-A-0388232】）。こうしてC型肝炎ウイルス（HCV）による感染を診断する方法としては、1988年に米国カイロン社よりC100-3抗原を使用したHCV抗体測定系が開発された。このC100-3と呼ばれる抗原は、そのアミノ末端にヒトスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）に由来する154個のアミノ酸残基、EcoRI制限酵素部位を含む合成DNAアダプターの発現で導かれる5個のアミノ酸残基、クローニングされたHCVゲノム由来のcDNAフラグメントの発現で導かれる363個のアミノ酸残基及びMS2クローニングベクターDNAから導かれる5個のカルボキシ末端にある5個のアミノ酸残基を含むものであると報告されている。

【0004】1991年には、HCVゲノム上の構造領域であるコア領域およびC100-3抗原とは重複しないNS3領域にコードされる33C抗原の使用により更に感度および検出率の優れたHCV抗体測定系が開発された。さらにNS4領域にコードされる抗原の使用も図られている。これらHCV抗体の測定法としては、赤血球やラテックス粒子を抗原担持担体として用いる凝集法、ビーズ、チューブ、あるいはプレートを抗原固相化担体として用いるイムノメトリック法等が用いられている。

【0005】しかし、抗原を担体上へ固相化する工程中あるいは調製された試薬の保存中に抗原の活性が反応溶液中で急激に低下し、抗原抗体反応が十分に進行できないために測定感度が十分に上がらない、更には抗原の活性が経時的に変化するために感度の再現性が悪化する等の問題があった。本発明者等は先にこのHCV抗体測定系における感度不良の問題は、HCV抗原、特にHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質に含まれているシステインが自然酸化を受け、ジスルフィド結合等になることに起因するとの知見に基づきHCV測定系に還元剤、特にチオール保護剤を添加することにより、そのHCV抗体測定系の感度の低下の問題を防止でき、さらにその還元剤処理は該測定系に悪影響を与えないものであることを確かめた。こうして検体中のHCV抗体を免疫学的方法により測定するための試薬において、該HCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬に還元剤を含有せしめること、あるいは担体に固相化したHCV抗原またはそれと実質的

に同等の作用を有するペプチドを還元剤で処理した試薬を提供した。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】こうした試薬を用いてさらに研究を進めるなかで、HCV陽性検体中にはHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質に含まれているシステインの酸化型に対する抗体よりもその還元型に対する抗体の方がC型肝炎ウイルス（HCV）に曝された個体の体液中でははるかに高い力価で存在を示すことを見出した。したがって、HCV陽性検体を検出するには安定してHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質のうち還元型システイン残基を含有するタンパク質部分に対する抗体（以下、単に「抗還元型HCV抗体」という。）を検知する系を利用するのが有用である。しかしながら、これまでは上記したようにペプチド含有試薬に還元剤を含有せしめるとか、担体に固相化したHCV抗原を一旦還元剤で処理するなどのことしかなされておらず、確実に抗還元型HCV抗体のみを検知する系は他には知られていなかった。また、一旦還元型のシステイン残基を含有するタンパク質部分が測定の途中などで酸化型に変化してしまうという問題を解決できなかった。

#### 【0007】

【課題を解決する手段】本発明者等は、より確実にHCV陽性検体を検出するためには、安定して少なくとも該抗還元型HCV抗体を検出できる測定系であれば、非常に有用との考えのもと鋭意研究した結果、HCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質、特に33C抗原のうちのシステイン残基を該抗還元型HCV抗体とのみ反応できるようにすればよいことを見出し、本発明を完成したものである。

【0008】即ち、本発明は、検体中のHCV抗体を免疫学的方法により測定するための抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、該HCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質抗原（以下、単に「NS3抗原」という。）またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド（以下、単に「NS3抗原関連ペプチド」という。）中に存在するシステイン残基を、該NS3抗原またはNS3抗原関連ペプチドに存在する還元型システイン残基を含有するタンパク質抗原部分に免疫学的かつ特異的に反応性の抗体（以下、単に「抗還元型HCV抗体」という。）と免疫学的かつ特異的に反応性の残基に変換または保持されていることを特徴とする試薬及びその製造法に関する。なお、NS3抗原及びNS3抗原関連ペプチドを含めて、NS3関連抗原と略称する。該抗還元型HCV抗体は、HCV陽性検体において抗酸化型HCV抗体よりもはるかに高い力価で存在することが見出され、この抗還元型HCV抗体に特異的に反応する抗原を試薬として用いることにより、測定系の感度を高めたり、測定結果の信頼

性を高めることができる。ここで抗酸化型HCV抗体とはNS3抗原に対して酸化状態においても反応性の抗体を指す。

【0009】NS3関連抗原中に存在するシステイン残基は、以下(1)～(5)からなる群から選ばれた処理を施すことにより、該抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的に反応性の残基に変換するかまたはそのような残基を保持しているようにされることができると考えられるが、要は該NS3関連抗原が該抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的に反応性のものに変換されるか、あるいは該抗還元型HCV抗体と免疫学的かつ特異的な反応性の保持されているものであればよい。

(1) NS3関連抗原をその中に存在するシステイン残基が還元型となるよう還元剤で処理し、得られた還元型NS3関連抗原を乾燥状態、不活性ガス中あるいは脱酸素剤存在下で保持する、(2) NS3関連抗原中に存在するシステイン残基のチオール基を、チオール基保護または修飾試薬、例えばヨードアセトアミド、ヨード酢酸、p-クロロマーキュリ安息香酸、ヨウ化メチル、あるいは水銀、鉄、鉛などの金属などで修飾する、(3) NS3関連抗原中に存在するシステイン残基を、遺伝子組換え技術、例えば特定部位変異誘発法などにより修飾し、変異体リコンビナントNS3抗原またはNS3抗原関連ペプチドを製造する、(4) NS3関連抗原をその中に存在するシステイン残基が還元型となるよう還元剤で処理し、次に還元剤除去後得られた還元型の該NS3関連抗原を酸化防止剤の存在下使用直前まで保持する、

(5) NS3関連抗原の中に存在するジスルフィド結合(—S—S—)を開裂させて、チオール基を形成できる酵素、例えばジスルフィド・レダクターゼなどで処理する、及び(6) NS3関連抗原の中に存在するシステイン残基に基質親和性をもつものでNS3抗原またはNS3抗原関連ペプチドを処理する。

【0010】本発明で用いる抗原としては、システイン残基を有するものであり、特に還元型システイン残基を有するものである。特表平2-500880号公報、欧州特許公開第318216号[EP-A-0318216]、同第388232号[EP-A-0388232]には、C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノムのクローニングにより得られたDNA配列をもつクローンが開示されており、その開示された配列を利用して得られ、システイン残基を有するものは、本発明で用いる抗原の一つとして考えられる。上記文献には、C100-3クローンにより発現されるC100-3抗原の記載があり、このC100-3と呼ばれる抗原は、そのアミノ末端にヒトスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)に由来する154個のアミノ酸残基、EcoRI制限酵素部位を含む合成DNAアダプターの発現で導かれる5個のアミノ酸残基、クローン化されたHCVゲノム由来のcDNAフラグメントの発現で導かれる363個のア

ミノ酸残基及びMS2クローニングベクターDNAから導かれる5個のカルボキシ末端にある5個のアミノ酸残基を含むと報告されている。HCV配列の第1番目～第150番目のアミノ酸残基を含むものはHCVコア(Core)抗原として知られている。HCV配列の第1192番目～第1457番目のアミノ酸残基を含むものは、NS3領域からのポリペプチドでクローン33により発現され、33C抗原として知られている。HCV配列の第1676番目～第1931番目のアミノ酸残基(256個のアミノ酸残基からなる)を含むものは、NS4領域からのポリペプチドである。本発明で用いる抗原としては、NS3領域からのポリペプチドが挙げられ、特に、33C抗原またはそれと実質的に同様な活性を持つものが挙げられる。

【0011】ここで抗原の活性とは、特異的な抗原抗体反応をなすことができるものをいい、特に検体中の特異抗体と免疫学的方法で反応する特異抗原の活性を指すもので、抗還元型HCV抗体と反応しうるものである。本発明で用いる抗原は、このような性状を持つものであれば、遺伝子工学的的手法によって作製された発現産物たる組換え抗原、あるいは合成ペプチドであるものも格別の制限無く用いることが出来る。本発明で用いられる遺伝子工学的的手法によって作製された発現産物たる組換え抗原、すなわち遺伝子組換え法で産生された抗原は、例えば遺伝子組換え技術を適用し、天然HCVなどのウイルスなどからクローニングにより得られたDNA配列あるいは既に知られたHCVなどのゲノム配列から、酵素などを用いたり、化学合成により得られたDNA配列を、微生物あるいは動物、植物、昆虫及びそれらの培養細胞などで発現させて得られたリコンビナント抗原である。このリコンビナント抗原としては、例えば、HCVなどのゲノムの別々の抗原領域を発現させた組換え蛋白質(リコンビナント蛋白質)の少なくとも1種であることができる。本発明で用いられる遺伝子組換え法で産生された抗原としては、好ましくは融合蛋白質として得られるものである。特に、本発明の上記(3)の処理方法では、変異体リコンビナントNS3抗原またはNS3抗原関連ペプチド(変異体リコンビナントNS3関連抗原)を合成するには、例えば、特定部位変異誘発法(アル、ウー(R. Wu)及びエル、グロスマン(L. Grossman)編、メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、Vol. 154、アカデミック・プレス、ニュー・ヨーク(Academic Press, New)、1987年、セクションIV、第3291頁以降、例えば、第329頁、第350頁、第367頁、第382頁など)などの方法に従って行うことができる。該システイン残基は、例えば、欠失などの除去を施したり、あるいは他のアミノ酸で置換したり、さらには近傍配列を除去したり、他の配列で置換するなどの処理ができる。これらの決定は実験により

なすことができる。該システイン残基は、中性のアミノ酸、例えば、グリシン、バリン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、セリン、スレオニン、メチオニンなどに置き換えることが挙げられる。

【0012】さらに好ましくはこのリコンビナント抗原はCKS、SOD、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルタチオン

S-トランスフェラーゼ、プロテインAのIgG結合領域、マルトース結合蛋白質、あるいはそれらの関連蛋白質の融合蛋白質として得られるものであることができる。例えば、宿主細胞として大腸菌を用いてCKS融合蛋白質発現系の遺伝子産物として得られるもの、特にCKSの全248個のアミノ酸配列のうち最初の239個のアミノ酸配列をもつものとの融合蛋白質、及び宿主細胞として酵母を用いてSOD融合蛋白質発現系の遺伝子産物として得られるものが挙げられる。

【0013】CKS融合蛋白質発現系によるものとしては、例えば、特開平4-253998公報や特開平4-281792公報に記載のものが挙げられ、さらには例えばpHCV-23リコンビナント抗原、pHCV-29リコンビナント抗原、pHCV-31リコンビナント抗原、pHCV-34リコンビナント抗原、pHCV-45リコンビナント抗原、pHCV-48リコンビナント抗原、pHCV-49リコンビナント抗原、pHCV-50リコンビナント抗原、pHCV-51リコンビナント抗原、pHCV-57リコンビナント抗原、pHCV-58リコンビナント抗原、pHCV-101リコンビナント抗原、pHCV-102リコンビナント抗原、pHCV-103リコンビナント抗原、pHCV-104リコンビナント抗原、pHCV-105リコンビナント抗原、pHCV-107リコンビナント抗原、あるいはそれらをペプチダーゼや化学的開裂試薬で処理などし、プロセッシングして得られたペプチド、例えばCKS遺伝子由来ペプチド部分の切断してあるものなどが挙げられる。融合部位は、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミン、ギ酸、酢酸-ピリジン溶液、2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-プロモインドール-スカルトールなどの化学的な処理で切断しうるといふものか、トリプシン、リシルエンドプロテアーゼ、Xa因子、トロンビン、ヒト血漿カリクレインなどの酵素で切断しうるといふものとされていることができる。こうして得られた形質転換体は、その大腸菌、酵母などの細胞を、ガラスビーズ、アルミナビーズなどを備えていてもよいホモジュナイザー、ワーリングブレンダー、フレンチプレス、超音波破碎機などの機械的方法、リゾチームなどの酵素による方法、凍結融解や浸透圧による物理的方法あるいはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、トウィーン(Tween:商品名)、トライトンX(Triton X:商品名)などの界面活性剤、アセトン、ブタノールなどの有機溶媒、EDTAなどのキレート化剤などを用いる化学的方法などにより破碎する

ことができる。細胞を破碎する際、懸濁液中にプロテアーゼ阻害剤などを添加しておくこともできる。

【0014】超音波処理は、例えば、懸濁溶液試料を10~60kHzの音波(超音波)を出すことのできる超音波振動子に適用することにより細胞を破壊することのできる装置にかけて行うことができ、そのような装置としては棒状の超音波振動子を試料に浸す型のものや、超音波振動子を取り付けたカップ状の容器に試料をいれ処理する型のものや、連続処理が可能のように循環式にされた型のもの、さらにはビーズなどと共に試料を処理できるようにしたもの等が挙げられる。こういった超音波破碎装置は、大岳製作所(株)、セントラル科学貿易(株)、セイコー電子工業(株)などから市販されている。超音波処理は、細胞を破碎するに十分な時間処理することにより行われ、使用試料の量や使用出力に応じて適宜適当に選ぶことができ、通常約1分から約2時間の範囲で選ぶことができる。

【0015】得られた抗原含有形質転換体細胞液は、例えば硫酸アンモニウムなどの蛋白質沈殿剤などを用いての塩析、エタノールなどの有機溶媒による沈殿法、界面活性剤などを用いての抽出、透析、密度勾配遠心などの遠心分離法、限外濾過法、イオン交換樹脂、イオン交換セルロース、イオン交換セファデックス、アルミナ、ハイドロキシアパタイトなどによる吸着、カラムクロマトグラフィー、電気泳動法、デキストランゲル、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコールジメタクリル酸ゲル、アガロースゲル、多孔質シリカガラス、分子ふるい法、モノクローナル抗体などを利用したアフィニティクロマトグラフィーによりさらに分離、精製されることができ、使用に適したものに加工できる。これらの処理は、任意に適した方法を選び組み合わせることでよい。これらの処理にあたっては、還元状態でその処理を行うことができ、例えば還元剤を含有する媒質を使用したり、酸素との接触を排除し得るように不活性ガス雰囲気中で処理をしたり、脱酸素剤共存下あるいは脱酸素剤のある雰囲気中で処理を行うことができる。還元剤としては、例えばジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、チオグリコール酸、システイン、グルタチオン、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミンおよびこれらの混合物から成る群より選ばれた少なくとも一つであるものにより処理されていることができる。この処理においては、特に、ジチオスレイトール、グルタチオン、2-メルカプトエタノール等が好ましい。

【0016】本発明で用いる抗原は、上記抗還元型HCV抗体と実質的に免疫学的に特異的に反応しうるといふ性状を持つものであれば、遺伝子工学的手法によって作製された発現産物たる組換え抗原、あるいは合成ペプチドであるものも格別の制限無く用いることができる。本発明においては、たとえ分子中にシステインのチオール基またはそれに由来するジスルフィド結合を有していてもそれ

らが該抗原の活性に影響を与えない場合は、本発明での処理をなす対象抗原としてそれを意図はしない。本発明で用いられる測定対象試料検体としては、全血、血清、血漿、などの生物由来材料をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0017】本発明では、不溶性担体などの担体に、上記の(1)～(6)からなる群から選ばれた処理を施して得られたNS3関連抗原を感作し、こうして得られた感作担体を用いて、検体中の特異抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬が製造される。上記(1)の方法に従えば、例えば担体にその還元型の抗原を感作した後、凍結乾燥させるか、又は得られた感作担体を実質的に還元剤非存在のもとで不活性ガス雰囲気の下、適当な緩衝液に分散させることにより達成することが出来る。こうして得られた試薬は不活性ガス雰囲気下その使用直前まで保存される。このようにして得られた試薬は、測定時においても還元剤非存在のもとでその測定を行うことが出来る。不活性ガスとしては、窒素ガス、アルゴンガス、ヘリウムガス、炭酸ガス、それらの任意の混合ガスなどが挙げられる。担体にその還元型の抗原を感作する前に、必要に応じ、抗原は例えばジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、チオグリコール酸、システイン、グルタチオン、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミンおよびこれらの混合物から成る群より選ばれた少なくとも一つであるものにより処理されていることができる。この処理においては、特に、ジチオスレイトール、グルタチオン、2-メルカプトエタノール等が好ましい。本発明においては、上記感作処理、凍結乾燥処理、保存及び測定操作のいずれかあるいはそのすべての処理にわたって脱酸素剤共存下または脱酸素剤のある雰囲気中で行うことができる。脱酸素剤としては、無機系の鉄粉末、アルカリ金属あるいはアルカリ土金属の亜硫酸水素塩、亜硫酸塩、チオ硫酸塩、ピロ亜硫酸塩など、有機系のアスコルビン酸、ヒドロキノ、カテコールなどが挙げられる。脱酸素剤としては、市販のエージレス(商品名)として入手できるものが挙げられる。ここで脱酸素剤としては、上記還元剤、さらにはチオール保護剤とは異なる。

【0018】ここで用いることが出来る不溶性担体としては、不溶性担体として広く知られたものが挙げられ、例えば合成樹脂、ニトロセルロース等の天然あるいは合成の高分子等から作られたものの他、ラテックス粒子等あるいは赤血球等が挙げられる。上記(2)の方法に従えば、例えば抗原をチオール基修飾試薬で処理し、次に修飾抗原を感作した後、適当な緩衝液に分散させることにより達成することが出来る。チオール基修飾試薬としては、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、ブロモ酢酸などのハロゲン酢酸またはそのアミド、2-ブロモプロピオン酸など、N-エチルマレイミド、p-クロロマーキュリ安息香酸、ヨウ化メチル、あるいは水銀、鉄、鉛な

どの金属、テトラチオン酸カリウム、テトラチオン酸ナトリウム、メチルメタンスルホネート、2-ヒドロキシエチルジスルフィド、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、N, N'-o-フェニレンジマレイミド、グルタチオン、ジチオピリジンまたはそのN-オキサイド体などが挙げられる。上記(4)の方法に従えば、例えば担体にその抗原を感作した後、得られた感作担体を酸化防止剤(還元剤やチオール保護剤を除く)を含有する雰囲気下、適当な緩衝液に分散させることにより達成することが出来る。また、本発明は、上記(1)～(6)からなる群から選ばれた処理を施して得られたNS3関連抗原を不溶性担体に固相化することによって得られた固相化抗原を用いて、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、あるいはフルオロイムノアッセイ(FIA)等の方法により検体中の特異抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬が製造される。不溶性担体にHCV抗原を固相化した後、得られた抗原結合固相を前記の(1)～(6)からなる群から選ばれた処理を施し、次に緩衝液に浸漬し、達成することが出来る。本発明において試料中の抗原と免疫学的に反応性の抗体を測定するにあたっては、抗原抗体反応にあずかる抗原は、必要に応じて、固定担体に固定しておき、この固定担体を、分析対象としての抗体等を含有する試料と接触させ、こうして固定担体に固定された抗原と、分析試料中の抗体等とを特異的に結合反応せしめ、この特異的に結合した分析対象物を検知することによりおこなうことができる。

【0019】ここで用いることが出来る不溶性又は固体の担体としては、固相化用担体として広く知られたものが挙げられ、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、テフロン、ポリアセタール、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体等のポリエステル、ポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂など合成樹脂、寒天、アガロース、架橋アガロース、架橋アルギン酸、架橋グアガム、紙、セルロース、ニトロセルロース、カルボキシルセルロースなどのセルロースエステルあるいは混合セルロースエステル、デキストラン、ゼラチン、キチン、コラーゲン、綿など、重合アミノ酸、多糖等の天然あるいは合成の修飾あるいは非修飾の重合炭水化物、重合炭化水素などの高分子、それらの架橋誘導体など、ガラス、例えば活性化ガラス、シリカゲル、アルミナ、カオリン、タルク、シリカーアルミナ、セラミック、カーボン、硫酸バリウム、硫酸マグネシウムなどから選ばれたものであり、粒子、微粒子、膜、ビーズ、チューブ、プレート、マイクロプレート、マイクロタイター・ウェル、マイクロチュー

ブ、ストリップ等の形状のものがある。さらには赤血球、ラテックス粒子、乳剤などが挙げられる。

【0020】本発明において試料中の抗原と免疫学的に反応性の抗体を測定するにあたっては、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学又は生物発光免疫測定法、及び凝集反応免疫測定法などの方法によることができる。また化学発光免疫測定法は自動化された測定ができ好ましい方法でもある。ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、化学又は生物発光あるいは蛍光免疫測定法などでは、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ などの放射性物質、西洋わさびペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素、フルオレッセインなどの蛍光色素、アクリジニウムエステル類などの化学発光色素、金コロイド、セレンコロイドあるいは有色ラテックス粒子などの有色物質、発光又は発色物質などで標識された抗原などが試薬として用いられ、分析試料中の抗体、複合体等と特異的に結合反応せしめられ、その放射活性、酵素活性、化学発光あるいは色の有無などを測定して、試料中の抗体等が存在していたか否かを判別することができる。

【0021】本発明においては、例えば、検知用試薬として、4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、ウンベリフェリルホスフェート、ニトロフェニルホスフェート、NADPなどとアルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬、放射性物質試薬、フルオレッセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、アクリジニウムエステル類、発光ランタニドなどを用いている蛍光試薬、発光試薬、化学発光試薬、金コロイド、銀コロイド、セレンコロイドなどのコロイド標識試薬、磁性体試薬、ビオチン標識抗ビオチン抗体などのハプテン標識抗ハプテン抗体検出系試薬などを用いることができる。

【0022】本発明においては、特に化学発光標識法、例えばアクリジニウムエステル類あるいは蛍光標識法、例えば発光ランタニドなどで標識された試薬を用いる蛍光あるいは化学発光免疫測定法は自動化された測定ができ好ましい方法である。特にアクリジニウムエステル類で標識された試薬を用いる化学発光免疫測定法は自動化された測定ができ好ましい。

【0023】アクリジニウムエステル類としては、例えば特開昭62-39598号公報、特開昭62-61969号公報、特開昭63-57572号公報、特開昭63-101368号公報、特開昭63-112564号公報、特開平1-261461号公報、英国特許明細書第1,461,877号、米国特許明細書第3,539,574号などに記載のN-アルキル又はアリールア

クリジニウム-9-カルボン酸エステルなどが挙げられる。特に、特開昭63-112564号公報、米国特許明細書第3,539,574号などに記載の10-アルキル・N-アルキル又はアリールスルホニル-N-アルキル又はアリールスルホニルアクリジニウム-9-カルボキシサミド、N-メチルアクリジニウム-9-カルボン酸エステルなどは代表的な化学発光標識として挙げられる。アクリジニウム標識の場合、測定前に発光開始試薬処理、例えば過酸化水素、例えば約0.01%~約0.1%の過酸化水素水溶液、及び水酸化ナトリウム、例えば約0.05N~約0.5Nの水酸化ナトリウム水溶液で処理しながら、ルミノメーターなどを用いて測定を行うことができる。

【0024】発光ランタニドとしては、例えば欧州特許公開出願第0068875号、米国特許明細書第4,374,120号、米国特許明細書第4,283,382号、米国特許明細書第4,259,313号、米国特許明細書第4,352,751号、米国特許明細書第4,432,907号、欧州特許公開出願第0103558号などに記載のアミノカルボン酸基を持つ発光ランタニドをキレート化できるものなどが挙げられる。また測定前にレーザー光などによる励起処理をして測定を容易にすることもできる。勿論、標識剤は上記のものに限定されることなく、測定に使用される機器、場所などを考慮し、適宜当該分野で使用することが知られているものの中から目的に応じ選択して用いることができる。

【0025】凝集反応を利用した測定法では、抗原を粒子状担体、例えば、赤血球、ポリスチレン粒子、ラテックス粒子などに結合させたいわゆる感作粒子抗原などの粒子状抗原と、それに対する抗体とが特異的に結合反応して観察できるような凝集塊をつくる反応を利用する。例えば、試料中の抗体を検知するため、上記したような粒子状抗原を試料と混合して反応させ、例えば、水性媒質の中で抗原抗体反応により生じた凝集反応を観察されるか否かにより、試料中に測定対象の抗体が存在しているか否かが判別される。この凝集反応を用いた測定法においては、一定量の抗原に対し、一定の希釈列にある既知濃度あるいは量の抗体を加え、反応の結果得られる溶液の凝集反応の程度を希釈倍数の逆数で表して評価されることがなされる。逆に一定量の抗体に対し、一定の希釈列にある既知濃度あるいは量の抗原を加え、反応の結果得られる溶液の凝集反応の程度を希釈倍数の逆数で表して評価されることもなされるし、更に抗体に対する抗体、すなわち二次抗体を用いて間接的な凝集反応を観察することもなされる。受身凝集反応免疫測定法は、本発明に従い、例えば、HCVに対する抗体などの測定に用いられ、優れた作用効果が得られる。

【0026】固体担体、粒子状担体あるいは標識などと抗原とを結合あるいは吸着させるには、当該分野で汎用されている方法を用いることができ、例えばイオン相互



作用、疎水相互作用、共有結合などの物理的吸着や化学的結合により行うことができる。化学的な結合剤としては、通常の当業者に知られたものの中から選択することができるが、例えば、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N, N'-o-フェニレンジマレイミド、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-スクシンイミジル S-アセチルメルカプトアセテート、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル 6-マレイミドヘキサノエート、N-スクシンイミジル 4-ヨードアセチルアミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオンネート、N-スクシンイミジル m-マレイミドベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-マレイミドブチレート、N-スクシンイミジル (p-マレイミドフェニル)アセテート、N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチレートなどが挙げられ、さらに6-マレイミドカプロン酸、2-プロモ酢酸、2-ヨード酢酸、コハク酸等の活性エステル、トリアジンの活性エステル、スルホン酸エステル誘導体等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0027】本発明の測定系においては、界面活性剤、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、ブロッキング剤、キレート化剤、保存剤などを用いることができる。界面活性剤としては、陰イオン型界面活性剤、陽イオン型界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン型界面活性剤のうちから選んで用いることが出来る。陰イオン型界面活性剤としては、炭素数12~18の高級脂肪酸のアルカリ金属塩あるいはアルカリ土類金属塩、炭素数12~18の高級脂肪酸のトリエタノールアミンなどの有機塩基塩、炭素数12~18の高級脂肪酸又は高級アルコールの硫酸エステル、アルキルスルホン酸塩、アルキルアリアルスルホン酸塩などが挙げられる。陽イオン型界面活性剤としては、アルキル基、アリアル基、複素環基などを有する第四級アンモニウム化合物などが挙げられる。アルカリ金属としては、ナトリウム、カリウム、リチウムなど、アルカリ土類金属としては、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。

【0028】両性界面活性剤としては、ポリアミノモノカルボン酸、炭素数12~18の高級アルキルアミノ酸、ラウリルジメチルベタインなどのアミノ酸のN-トリアルキル置換体などが挙げられる。非イオン型界面活性剤としては、モノステアリン酸グリセリンなどの炭素数12~18の高級脂肪酸の多価アルコールエステル、高級脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、高級脂肪酸のソルビタンエステル、高級脂肪酸とポリオキシエチレン及びソルビタンエーテルとのエステル、ポリオキシエチレンラウリルアルコールなどの高級アルコールとポリ

オキシエチレンとのエーテル、ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのエーテルなどが挙げられる。

【0029】緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、水、リン酸緩衝液、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝液、例えば生理食塩水などの塩化ナトリウム液、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)液、ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIBES)液、3-(シアノヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CAPS)液、3-(モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)液、N, N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)液、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)液、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独で用いることができるし、任意に二種以上を配合しても用いることができる。キレート化剤としては、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、エチレンジアミンテトラ酢酸(EGTA)などが挙げられる。これらキレート化剤は、約0.01mM~約20mMの範囲で用いることができる。

【0030】保存剤としては、例えばナトリウムアジド、エチルパラベンなどが挙げられる。その他、本発明の測定系には、各種動物の血清、例えば牛血清、牛血清アルブミン(BSA)、牛胎児血清(FCS)、ヤギ血清、卵白アルブミン、ゼラチン、各種乳蛋白質、例えばスキムミルク、カゼイン、カゼイン分解物、ホエー蛋白質など、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどからなる群から選ばれたものを添加することができる。これらは、約0.01%v/v~約50%v/vの範囲で添加することができる。

【0031】本発明においては、リンパ球破砕物、例えばヒトT-リンパ球抽出液、大腸菌抽出液、酵母抽出液、マウス細胞培養液抽出液などの細胞抽出物を添加することもできる。これらのものは、約0.001%v/v~約20%v/vの範囲で添加することもできる。

【0032】

【実施例】次に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明する。

#### 実施例1

固定化用ヒト赤血球をリン酸緩衝液(pH7.4)で3回洗浄後、pH5.7の酢酸緩衝液に1容量%となるように懸濁し、遺伝子組換え技術により産生された精製HCV 33C抗原を最終濃度が、6μg/mlとなるように添加し、室温で1時間攪拌した後に、リン酸緩衝液(pH7.4)で3回洗浄し、7.5%のサッカロース及び30mMのグルタチオン(GSH)を含有するリン酸緩衝液(pH7.4)中で凍結乾燥して、33C抗原

感作赤血球を調製した。

【0033】得られた33C抗原感作赤血球をトリス塩酸緩衝液(pH7.8)の入ったボトルに、1容量%となるように注入し、懸濁させた。33C抗原感作赤血球懸濁液が入った該ボトルを酸素濃度の約2倍量及び20倍量の脱酸素剤エージレス(商品名、三菱ガス化学社製)と共に非開放空間に保存した。対照として33C抗原感作赤血球懸濁液の入ったボトルを脱酸素剤不存在下開放空間に放置したものをを用いた。こうして調製された33C抗原感作赤血球懸濁液を用い、0~9日間その液を25℃に静置した後、感度比較を行った。感度の比較は、33C抗体陽性ヒト血清を、同抗体陰性である血清\*

表1 脱酸素剤の感度に及ぼす影響

脱酸素剤量	開 始	2 日 目			5 日 目			7 日 目			9 日 目		
		0	X2	X $\geq$ 20	0	X2	X $\geq$ 20	0	X2	X $\geq$ 20	0	X2	X $\geq$ 20
パ A	3	3	3	3	-	3	3	-	3	3	-	3	3
ネ													
ル B	3	3	3	3	-	3	3	-	3	3	-	3	3
検													
体 C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	25	3	3
陰性対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽性対照	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
試薬対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 【0035】実施例2

33C抗原感作赤血球保存用ボトル内にヘリウムガスを封入しておき、さらにトリス塩酸緩衝液(pH7.8)を入れておく。実施例1と同様にして得られた凍結乾燥33C抗原感作赤血球を用い、該ボトルに、1容量%となるように該HCV抗原感作赤血球をシリンジを使用して注入し、33C抗原感作赤血球を懸濁した。対照として何らヘリウムガスなどの不活性ガスの加えてないボトル中のトリス塩酸緩衝液に懸濁した33C抗原感作赤血球液を用いた。こうして調製された33C抗原感作赤血球懸濁液を用い、0~9日間その液を25℃に静置した後、実施例1と同様にして感度比較を行った。結果は図1に示す。ヘリウムガス封入ボトルでの33C抗原感作赤血球液の場合には、16日後でも十分に感度を保持できていたが、空気中で保存された33C抗原感作赤血球液の場合5日目で感度がなくなり、2日目で実質上その使用に問題なものとなっていた。

#### 【0036】実施例3

実施例1と同様にして調製された凍結乾燥33C抗原感作赤血球を用い、トリス塩酸緩衝液(pH7.8)を含

\*により予め段階希釈したものを感度管理用血清として使用した。マイクロタイター・プレートの各ウエルに、リン酸緩衝液(pH7.4)25 $\mu$ l、及び各濃度の感度管理用血清25 $\mu$ lを分注し、さらに感作赤血球を25 $\mu$ l分注し、ミキサーで30秒間攪拌し、室温で1時間放置した後、結果を目視により判定した。結果は表1に示す。対照33C抗原感作赤血球液を用いた場合、5日目にはAパネル及びBパネル血清検体で感度の消失が認められたが、脱酸素剤付加群ではいずれのパネル血清検体でも感度に変化は認められ無かった。

#### 【0034】

#### 【表1】

有するボトル中で4容量%となるようにその33C抗原感作赤血球を懸濁した後、凍結乾燥した。こうして調製された33C抗原感作赤血球を(1)1%牛血清アルブミン(BSA)、6%牛胎児血清(FCS)含有110mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)に再懸濁した後、室温で1時間置いたもの、(2)(1)と同様に再懸濁後、室温で空気雰囲気中に曝したまま4日間置いたもの及び(3)(2)と同様4日間空気雰囲気中に放置した後、30mMグルタチオン含有110mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)で処理した33C抗原感作赤血球を室温で1時間置いたものそれぞれを用い試験した。検体としては、5'NC-region-RT-PCR法HCV RNA陽性を示した血清及び陰性を示した血清を用いた。血清は実施例1に準じてHCV抗体陰性である血清により予め段階希釈し、感度管理用血清として使用し、測定を行った。結果は表2に示す。PCR法陽性及び陰性血清検体共に、(1)再懸濁後1時間血球で測定されうる還元型抗原に対する抗体のタイター(titer)のほうが、(2)再懸濁後4日間置かれた血球で測定されうる酸化型抗原に対する抗体のタイターより高か

った。さらに、酸化型抗原をグルタチオン溶液で還元処理すると(1)と同様の抗原の反応性が再現されることが観察された。

\*【0037】

【表2】

\*

表2 HCV 33C抗原に対する抗体のタイター

検体 番号	PCR法陰性検体			検体 番号	PCR法陰性検体		
	還元型	酸化型	再還元型		還元型	酸化型	再還元型
	33C抗原 (1)	33C抗原 (2)	33C抗原 (3)		33C抗原 (1)	33C抗原 (2)	33C抗原 (3)
49	6	<3	6	46	6	<3	6
40	7	3	7	58	13	9	13
54	7	3	7	48	13	<3	13
53	7	4	7	7	15	9	14
51	7	<3	7	62	15	10	15
39	8	5	7	57	16	10	16
29	8	<3	8	9	>14	7	>14
26	9	7	9	13	>16	7	>16
15	11	5	11	10	>16	10	>16
34	11	5	10	11	>16	10	>16
55	11	5	11	34	>16	10	>16
56	11	<3	11	6	>16	11	>16
50	12	7	11	17	>16	11	>16
52	13	7	13	12	>16	12	>16
20	15	8	15	13	>16	12	>16
38	>14	8	>14	5	>16	13	>16
28	>14	9	>14	14	>16	14	>16
41	>14	10	>14	15	>16	14	>16
25	>16	14	>16	38	>16	14	>16
14	>16	15	>16	8	>16	15	>16

#### 【0038】実施例4

HCV抗原のコア抗原、C100抗原及び33C抗原を  
実施例1と同様にして感作して各HCV抗原感作赤血球  
を調製した。同様にHCV抗原としてコア抗原、C10  
0抗原及び33C抗原の混合物を用いHCV PHA抗  
原感作赤血球を調製した。HCV 33C抗原感作赤血  
球中のシステイン残基は十分に還元型であることが認め  
られていた。この各HCV抗原感作赤血球を用い、実施  
例1に準じて感度比較を行った。結果は図2及び図3に  
示す。図2(a)は、HCV PHA抗原感作赤血球で  
の結果を示し、図2(b)は、HCV 33C抗原感作  
赤血球での結果を示し、図3(c)は、HCV コア  
抗原感作赤血球での結果を示し、図3(d)は、HC

V C100抗原感作赤血球での結果を示す。HCV  
PHA抗原感作赤血球での結果とHCV 33C抗原感  
作赤血球での結果とはその分布がよく一致し、還元型3  
3C抗原がHCV抗体測定試薬として非常に有用である  
ことが証明された。

#### 【0039】実施例5

実施例1と同様にして得られた33C抗原感作赤血球を  
7.5%のサッカロース及び10mMのジチオスレイト  
ール(DDT)を含有するリン酸緩衝液(pH7.4)  
中で凍結乾燥して、33C抗原感作赤血球を調製した。  
得られた33C抗原感作赤血球を用い、実施例1に準じ  
て感度比較を行った。実施例1と同様な結果が得られ  
る。

## 【0040】実施例6

1/4インチのポリスチレン・ビーズを7.5%のサッカロースを含有するリン酸緩衝液(pH7.4)の中に入れ、実施例1で使用した遺伝子組換え技術により産生された精製HCV 33C抗原を最終濃度が、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間静置した。次にリン酸緩衝液(pH7.4)で3回洗浄後、7.5%のサッカロース及び20mMの2-メルカプトエタノール(2-ME)を含有するリン酸緩衝液(pH7.4)中に浸漬し、ついで乾燥処理し、33C抗原固相化ビーズを得た。対照固相化ビーズとして、2-MEを含まない7.5%のサッカロース含有リン酸緩衝液(pH7.4)中に浸漬し、ついで乾燥処理して得られた33C抗原固相化ビーズを用いた。

【0041】保存33C抗原固相化ビーズ1個を、反応用緩衝液としてトリス塩酸緩衝液(pH7.8)200 $\mu\text{l}$ を入れた反応試験管に入れ、各濃度の感度管理用血清10 $\mu\text{l}$ を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。反応終了後、生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリンG抗体200 $\mu\text{l}$ を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で30分間反応させた。反応終了後、生理食塩水で3回洗浄し、オルトエチレンジアミン及び過酸化水素を含む基質溶液を1ml加え、室温で30分間反応させ

た後、1N硫酸溶液1mlを添加し、反応停止後490nmの吸光度を測定することにより判定した。2-ME処理ビーズは、感度が優れていた。

## 【0042】実施例7

7.5%のサッカロース及び40mMのグルタチオン(GSH)を含有するリン酸緩衝液(pH7.4)中に浸漬し、ついで乾燥処理する以外は、実施例6と同様に処理し、33C抗原固相化ビーズを調製した。得られた33C抗原固相化ビーズを用い、実施例6と同様にして感度比較を行った。実施例6と同様な結果が得られる。

## 【0043】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 ボトル中の不活性ガスの影響を示す。Heはヘリウム含有の場合、Cont.は対照試験を示す。

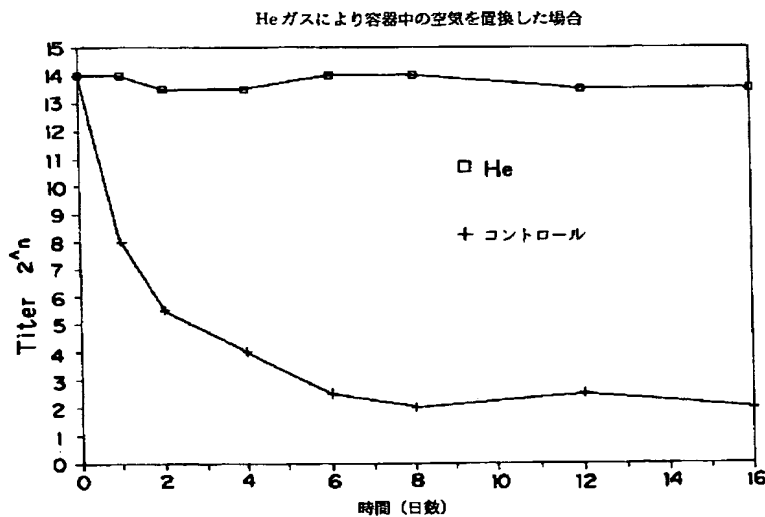
【図2】 各HCV抗原感作赤血球とHCV抗体陽性血清における検出感度との関係を示す。縦軸はNumberを示す。

【図3】 各HCV抗原感作赤血球とHCV抗体陽性血清における検出感度との関係を示す。縦軸はNumberを示す。

【図4】 図2及び図3の結果の相関関係を示す。

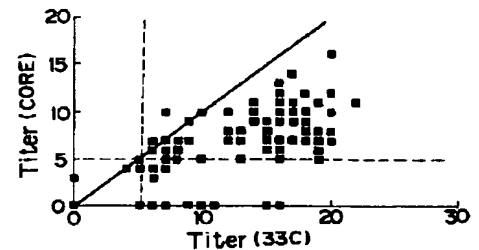
【図5】 図2及び図3の結果の相関関係を示す。

【図1】



【図5】

(C)



BEST AVAILABLE COPY

【図2】

図2 (a)

HCV PHA 抗原感作赤血球

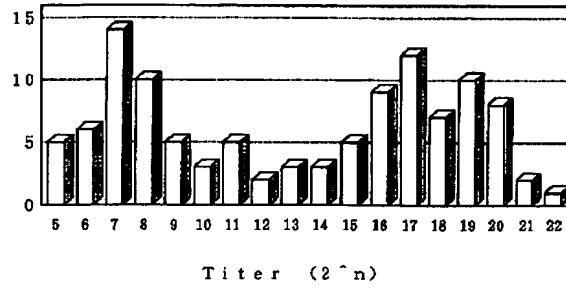
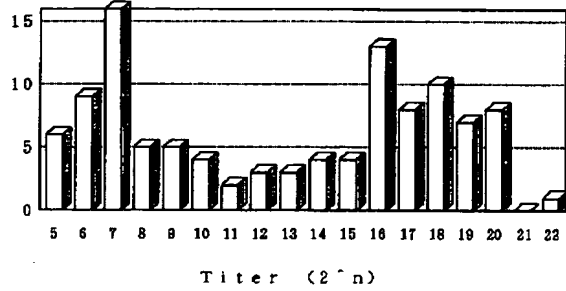


図2 (b)

33C 抗原感作赤血球



【図3】

図3 (c)

コア (CORE) 抗原感作赤血球

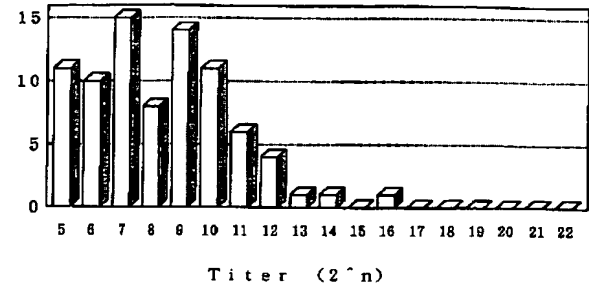
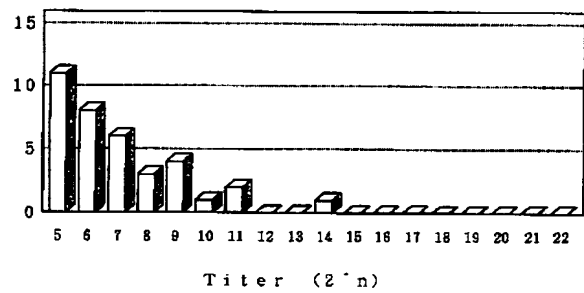


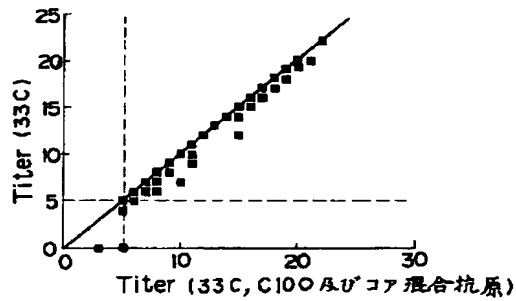
図3 (d)

C100 抗原感作赤血球

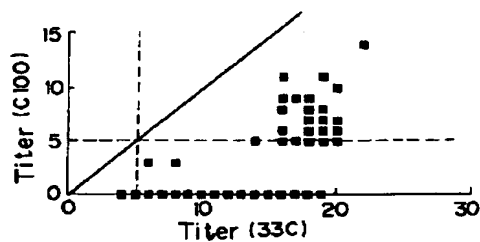


【図4】

(a)



(b)



BEST AVAILABLE COPY